

Estudos anatómicos e histológicos em folhas de roseira desenvolvidas em diferentes condições de humidade relativa

A. Monteiro¹, D.R.A. Carvalho², M.W. Vasconcelos², C. Correia³, J.M. Moutinho-Pereira³, B. Gonçalves³, E. Bacelar³, S.M.P. Carvalho^{2,4,*}

¹ Mestrado da Escola Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

² CBQF – Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Centro Regional do Porto da Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

³ CITAB - Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-ambientais e Biológicas, Departamento de Biologia e Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

⁴ Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Departamento de Geociências Ambiente e Ordenamento do Território, Rua do Campo Alegre 697, 4169-007 Porto, Portugal

* Autor correspondente: smcarvalho@porto.ucp.pt

Resumo

A humidade relativa elevada (HR > 85%) durante o cultivo de rosas de corte tem implicações negativas na longevidade pós-colheita, estando descritas diferentes suscetibilidades entre cultivares. No presente estudo foi avaliado o efeito da HR ao nível das características anatómicas e histológicas das folhas em seis genótipos pertencentes a uma população segregante tetraploide de rosas de corte (quatro sensíveis e dois com resposta intermédia à desidratação) cultivados em HR moderada (60%) ou elevada (90%). Folhas desenvolvidas a HR elevada apresentaram uma maior área foliar específica (aumentos de 12,8% e 26,8% nos genótipos sensíveis e intermédios, respetivamente) e menor suculência (redução em 9,5 % nos genótipos sensíveis e 10,7% nos genótipos intermédios). Verificou-se igualmente nestas condições um decréscimo da espessura da lâmina total, da cutícula, da epiderme de ambas as faces e da densidade estomática, embora se tenha observado um aumento significativo das dimensões do aparelho estomático. Conclui-se que a HR tem um papel determinante na modificação da estrutura foliar.

Palavras-chave: estomas, estruturas de proteção, qualidade pós-colheita, *Rosa × hybrida*.

Abstract

High relative air humidity (RH > 85%) during growth has a negative impact on postharvest longevity of cut roses, being described a different susceptibility among cultivars. In this study, we evaluated the effect of RH on leaf anatomical and histological characteristics in six genotypes from a cut rose segregating tetraploid population (four sensitive and two with intermediate response to desiccation) grown at moderate (60%) or high (90%) RH. Leaves developed at high RH showed larger specific leaf area (increasing 12.8% and 26.8% on the sensitive and intermediate genotypes, respectively) and lower succulence (reducing 9.5% on the sensitive and 10.7% on the intermediate genotypes). Moreover, these leaves also showed a reduced thickness of the total lamina, cuticle and the upper and lower epidermis. Stomatal

density was also reduced but stomatal dimensions were significantly larger at high RH. It is concluded that RH plays a very important role on the modification of leaf structure.

Key-words: postharvest quality, *Rosa* × hybrid, stomata, thinnest protective.

INTRODUÇÃO

Rosas cultivadas em ambientes de humidade relativa elevada ($HR > 85\%$) quando posteriormente transferidas para ambientes de menor HR, apresentam elevadas perdas de água com consequências negativas ao nível da longevidade pós-colheita (Fanourakis *et al.*, 2012). No entanto, verificou-se que em *Rosa* × *hybrida* a sensibilidade à HR elevada depende da cultivar (Carvalho *et al.*, 2008). O mau funcionamento estomático tem sido apontado como a principal causa da acentuada perda de água, como consequência de uma reduzida concentração de ácido abscísico (ABA) ao longo do desenvolvimento da folha (Rezaei Nejad e van Meeteren, 2007). Porém, até à data ainda não foram efetuados estudos integrados acerca do efeito da HR ao nível das características anatómicas e histológicas de cultivares com diferentes sensibilidades à HR.

Para um conhecimento mais profundo sobre os efeitos da HR, foi avaliada a variabilidade intraespecífica existente ao nível das características morfo-anatómicas das folhas de roseiras cultivadas em humidade relativa moderada (60%) e elevada (90%).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Neste estudo foram avaliados quatro genótipos de *Rosa* × *hybrida* com elevada sensibilidade à desidratação (K039, K123, K148 e P867) e dois genótipos com sensibilidade intermédia à desidratação (K085 e K121), estudados ao longo de um período de 4h de dessecação de folíolos. Estacas enraizadas dos seis genótipos foram cultivadas em vasos de 3,6l contendo uma mistura de fibra de coco e perlite (3:1, v/v). Sete plantas de cada genótipo foram cultivadas em duas câmaras de crescimento do tipo “walk in” (Aralab, modelo 5000 EH, 2,0 x 1,6 x 2,0 m, Albarraque, Portugal). Nas duas câmaras, as condições foram constantes durante o crescimento da cultura. As plantas foram mantidas a uma temperatura de 19°C e $250\text{--}300\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa durante 18 h diárias. Numa das câmaras foi estabelecida uma HR moderada de $60 \pm 2\%$ enquanto na outra foi imposta uma HR elevada ($90 \pm 2\%$).

Diariamente as plantas foram regadas automaticamente com uma solução nutritiva standard ($\text{pH} = 5,4$; $\text{EC} = 2\ \text{mS cm}^{-1}$) (Carvalho *et al.*, 2011). A amostragem das folhas para este estudo ocorreu quando as hastes florais se encontravam no estado 2 (i.e. botão floral cilíndrico; VBN, 2005), o que corresponde à colheita comercial e à máxima expansão foliar.

Anatomia foliar

Para os estudos anatómicos foram realizadas preparações definitivas de sete folíolos terminais de cada uma das plantas em estudo. Estas preparações definitivas foram elaboradas com técnicas usuais de inclusão em parafina após desidratação em série alcoólica etílica (Johansen, 1940; Berlyn e Miksche, 1976) e coradas com azul de toluidina 0,1% (O’Brien *et al.*, 1964). Os cortes histológicos foram fotografados num microscópio ótico invertido (Olympus IX51, OlympusBiosystem, Munique, Alemanha), equipado com uma câmara digital (ColorViewIII, Soft ImagingSystemGmbH, Münster,

Alemanha) e analisados utilizando o programa UTHSCSA ImageTool version 3.00 (University of Texas Health Science Centre, San Antonio, EUA).

As medidas de espessura da lâmina foliar, cutícula e epiderme adaxial e abaxial foram realizadas na região mediana da lâmina foliar em 10 cortes por tratamento com ampliação de 200x. Para complementar os estudos anatômicos e histológicos procedeu-se à determinação da área foliar (LA; AM 300, ADC BioScientific, Hoddesdon, Inglaterra) e do peso seco das folhas (24 h a 70 °C), permitindo calcular a área foliar específica (SLA = área foliar / peso seco; cm² g⁻¹) e suculência (S = [(peso fresco - peso seco) / área foliar] × 1000; mg cm⁻²).

Frequência e índice estomático e morfologia dos estomas

Para avaliar as características estomáticas foram realizados impressões do folíolo terminal de plantas provenientes de ambas as HR, através da aplicação de uma pasta de silicone (Xantopren VL Plus® + Activator®, Heraeus, Alemanha) sobre a superfície da epiderme abaxial das folhas. Por cada impressão foram efetuadas cinco fotografias digitais de diferentes campos da superfície da folha com recurso a uma câmara fotográfica (NIKON DS Camera Control unit DS-02, Nikon Crop. Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio (NIKON, Nikon Crop. Tóquio, Japão). A análise das imagens obtidas foi realizada com recurso ao programa UTHSCSA ImageTool version 3.00 (University of Texas Health Science Centre, San Antonio, EUA). A densidade estomática foi determinada com recurso a uma ampliação de 100× através da contagem do número de estomas por mm² e permitiu o cálculo do índice estomático usando a seguinte equação de Weyers e Meidner (1990).

$$\text{Índice estomático} = \frac{\text{Densidade estomática}}{\text{Densidade estomática} + \text{Densidade das células epidérmicas}} \times 100$$

Por sua vez, para a medição do tamanho dos estomas e da abertura dos respetivos ostíolos utilizou-se uma ampliação de 400×.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As epidermes adaxial e abaxial são compostas por uma única camada de células com uma parede externa muito espessa e completamente cutinizada (Fig. 1). Verificou-se que todas as folhas apresentam um mesófilo heterogéneo, geralmente com uma camada de células de parênquima clorofilino em paliçada associado à página adaxial e parênquima clorofilino lacunoso adjacente à página abaxial. É ainda de salientar que apenas foram observados estomas na epiderme abaxial (Fig. 1).

Relativamente à espessura dos tecidos verificaram-se diferenças altamente significativas para a espessura das cutículas adaxial e abaxial ($P < 0,001$) e diferenças muito significativas entre genótipos para a espessura da epiderme abaxial ($P = 0,002$) (Tabela 1). A HR influenciou significativamente a espessura da lâmina total, cutícula adaxial e abaxial e epiderme adaxial e abaxial. De um modo geral, a espessura da lâmina total foi inferior em todos os genótipos desenvolvidos a 90% de HR comparativamente aos desenvolvidos a 60% de HR. Contudo, verifica-se uma exceção para o genótipo K085, que apresentou maior espessura de lâmina total em 90% HR. De uma forma geral, a menor espessura das folhas das plantas cultivadas a 90% de HR está associada à menor espessura da cutícula e epiderme em ambas as faces (Tabela 1), o que pode contribuir para uma maior perda de água nestas folhas e uma mais rápida dessecação das hastes florais quando estas são transferidas para ambientes de menor HR

durante o período de pós-colheita. Torre *et al.* (2003) também verificaram que a HR elevada levou a uma diminuição da espessura as células epidérmicas e diminuiu o número de células do parênquima em paliçada e lacunoso em folhas de roseira da cultivar “Baroness”.

No que respeita aos parâmetros morfo-estruturais, verificou-se que apenas se registaram diferenças altamente significativas entre genótipos e HR para a área foliar específica (SLA) e suculência (S) (Tabela 1). Todos os genótipos desenvolvidos em HR elevada apresentam maior SLA (aumento de 12,8% e 26,8% nos genótipos sensíveis e intermédios, respetivamente) e menor S (diminuição de 9,5 % no genótipos sensíveis e 10,7% nos genótipos intermédios).

De uma maneira geral, observou-se que as folhas das plantas cultivadas em níveis de HR elevada apresentam menor densidade estomática comparativamente às das plantas desenvolvidas em HR moderada (Tabela 2). O genótipo sensível K039 apresentou maior aumento da densidade estomática em HR moderada e o genótipo sensível K148 foi o único que apresentou maior densidade estomática em HR elevada. Relativamente ao índice estomático verificou-se que apenas se registaram diferenças altamente significativas entre genótipos. Globalmente verificou-se um aumento do índice estomático com o aumento da HR elevada, sendo este aumento mais evidente no genótipo sensível K148. No que respeita às dimensões estomáticas, a elevada HR do ar durante o período de cultivo promoveu um aumento de 15% a 32% do comprimento e largura do ostíolo em todos os genótipos comparativamente à HR moderada. Contudo, a magnitude deste efeito foi mais evidente para os genótipos sensíveis. A resposta dos genótipos perante a HR elevada, para as dimensões estomáticas, deveu-se à maior disponibilidade de vapor de água no ar, o que permite a planta abrir mais os seus estomas sem o risco de perder quantidades excessivas de água. No entanto, quando as hastes florais são transferidas para ambientes de menor HR após a colheita, os estomas maiores podem induzir maiores perdas de vapor de água, e consequentemente a haste floral pode desenvolver mais rapidamente sintomas de stress hídrico, o que limita a qualidade e longevidade em jarra. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores (Torre *et al.*, 2003; Fanourakis *et al.*, 2013), que concluem que HR elevada durante o desenvolvimento foliar induz um maior comprimento e largura dos estomas e respetivo ostíolo.

Referências

- Berlyn G.P., Miksche J.P. (1976). Botanical microtechnique and cytochemistry. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA: 326.
- Carvalho, D.R.A., Carvalho, S.M.P., Fanourakis, D., Heuvelink, E., Almeida, D.P.F. (2011). Melhoramento para elevada qualidade pós-colheita: validação do método de seleção de genótipos promissores. *Actas de Horticultura*, 19, 90-102.
- Carvalho, S.M.P., Fanourakis, D., Tapia, A., Almeida, D.P.F., Malcata, F.X., Heuvelink, E. (2008). Qualidade pós-colheita de rosas: efeitos da humidade relativa e da variação genotípica. *Actas de Horticultura*, 52, 118-123.
- Fanourakis, D., Carvalho, S.M.P., Almeida, D.P.F., van Kooten, O., van Doorn, W.G., Heuvelink, E. (2012) Postharvest water relations in cut rose cultivars with contrasting sensitivity to high relative air humidity during growth. *Postharvest Biology and Technology* 64: 64–73
- Fanourakis, D., Pieruschka, R., Savvides, A., Macnish, A.J., Sarlikioti, V., Woltering, E.J. (2013). Sources of vase life variation in cut roses: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 1-15.

- Johansen D.A. (1940). Plant microtechnique. McGraw Hill, New York: 523.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, 59, 368-373.
- Rezaei Nejad, A., Van Meeteren, U. (2007). The role of abscisic acid in disturbed stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* during growth at high relative humidity. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 627-636.
- Torre, S. (2003). Morphology and Anatomy: Leaves. In Roberts, A. V. (Ed.), *Encyclopedia of Rose Science* Oxford: Elsevier: 497-504
- VBN (2005). Evaluation cards for cut flowrs. VBN, Leiden, Holanda.
- Weyers, J.D.B., Meidner, H. (1990). *Methods in Stomatal Research*. Harlow, England: Longman Scientific & Technical.

Tabela 1 - Valores médios da espessura (μm) dos tecidos foliares, área foliar (LA), área foliar específica (SLA) e suculência (S) em seis genótipos (G) de roseira cultivados em ambientes de humidade relativa (HR) moderada (60%) e elevada (90%) (n = 7).

Genótipo	HR (%)	Lâmina total (μm)	Cutícula adaxial (μm)	Epiderme adaxial (μm)	Epiderme abaxial (μm)	Cutícula abaxial (μm)	LA (cm^2)	SLA ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$)	S ($\text{mg H}_2\text{O cm}^{-2}$)
K039	60	182,2	6,16	24,02	15,11	5,66	83,8	228,9	9,75
	90	174,0	5,94	25,58	15,04	4,31	81,4	263,8	8,71
K123	60	173,7	4,71	28,34	14,56	4,06	67,5	245,5	9,50
	90	159,2	4,24	20,23	10,69	3,39	68,8	256,4	8,86
K148	60	177,6	5,11	25,39	14,41	5,24	82,8	222,7	10,16
	90	163,5	4,94	23,35	10,71	3,99	80,5	271,0	8,68
P867	60	180,5	4,98	28,34	14,91	5,80	67,9	184,9	11,36
	90	173,2	4,81	23,50	10,67	3,39	80,0	208,9	10,33
K085	60	171,8	5,45	23,95	10,31	4,25	76,8	183,7	11,47
	90	174,5	4,42	26,53	10,77	3,05	67,3	245,2	9,62
K121	60	172,4	6,35	26,72	14,77	6,19	91,9	202,8	10,47
	90	167,1	6,42	23,82	12,23	5,25	97,3	244,7	9,97
P									
G		0,524	<0,001	0,891	0,002	<0,001	0,723	<0,001	<0,001
HR		0,025	0,029	0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
G×HR		0,703	0,343	0,003	0,092	0,020	0,100	0,370	0,161

Tabela 2 - Valores médios da densidade estomática, índice estomático e dimensões dos estomas e ostíolos em seis genótipos (G) de roseira cultivados em ambientes de humidade relativa (HR) moderada (60%) e elevada (90%) (n = 7).

Genótipo	HR (%)	Densidade estomática (estomas mm^{-2})	Índice estomático (%)	Estoma		Ostíolo	
				Comprimento (μm)	Largura (μm)	Comprimento (μm)	Largura (μm)
K039	60	80,7	25,0	24,5	16,9	15,7	5,8
	90	67,1	23,4	31,9	22,4	19,6	6,2
K123	60	97,9	24,2	25,4	18,8	15,6	6,9
	90	94,5	25,8	28,7	22,1	17,8	7,7
K148	60	63,0	18,9	24,9	16,8	15,5	5,8
	90	67,2	22,6	30,1	24,6	18,4	8,1
P867	60	92,4	25,7	25,1	18,5	15,9	7,5
	90	80,6	25,2	28,6	24,1	19,2	9,4
K085	60	103,8	24,7	27,5	18,7	17,6	6,0
	90	95,2	24,9	31,7	24,9	18,8	7,7
K121	60	83,7	21,2	24,9	17,7	16,4	6,1
	90	80,6	24,0	31,1	25,3	19,0	9,1
P							
G		<0,001	0,001	0,004	0,242	0,586	0,011
HR		0,002	0,057	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
G×HR		0,078	0,047	0,070	0,259	0,338	0,072

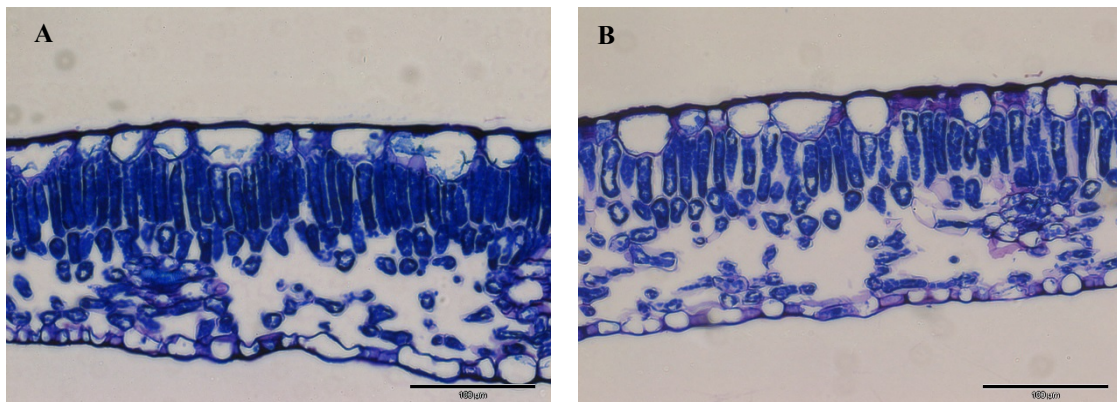


Figura 1 - Secções transversais da lâmina foliar do genótipo sensível K039 cultivado em HR moderada (60%; A) e elevada (90%; B). Escala - 100 µm.